

## FORMULASI MINUMAN INSTAN COKELAT SEBAGAI MINUMAN IMUNOMODULATOR

### *Formulation of Instant Chocolate Drinks as Immunomodulator Drinks*

**Rosniati, Muh. Ruslan Yunus dan Kalsum**

e-mail : rosniati.kasim8@yahoo.com

Balai Besar Industri Hasil Perkebunan

Jl. Prof. Dr. Abdurahman Basalamah No. 28, Makassar 90231

**Abstract :** *Instant chocolate drinks, as immunomodulator drinks, were developed from the instant chocolate - ginger drink of Rosniati, as a functional drink (2011). Drinks were formulated from 55 % sucrose, 30 % cocoa powder (processed from non - fermented and non roasted cocoa beans), and 15 % non - dairy creamer, in (w/w), as A formula, and the other from 55 % sucrose, 30 % cocoa powder (processed from non - fermented and non - roasted cocoa beans), and 15 % instant soy powder, in (w/w), as B formula. Preparation of drinks also used co-crystallization technique. Of the two formulas, the B formula (combination of cocoa powder and instant soy powder), in the in-vivo tests, showed better in immunomodulation effects. Indeed, at a dose of 39 (mg/kg of mice weight), the B formula had non specific immune response with phagocytic index of 2.042 (strong), primary antibody titer of 1 : 384 and secondary antibody titer of 1 : 768, as humoral immune response, and IFN-  $\gamma$  of 1,436,360.14 (pmol) and IL-2 of 941.30 (pmol), as cellular immune response, all above the control drink values.*

**Key words:** *instant chocolate drink, immunomodulator, non-fermented, non-roasted cocoa beans, instant soy powder .*

**Abstrak.** *Minuman instan cokelat sebagai minuman imunomodulator, dikembangkan dari minuman cokelat-jaja instan dari Rosniati, sebagai minuman fungsional (2011). Minuman imunomodulator diformulasi dari bubuk kakao 30% (diolah dari biji kakao tanpa fermentasi dan tanpa sangrai), gula sukrosa 55%, dan non-dairy creamer 15% (b/b), sebagai formula A, dan dari bubuk kakao 30% (diolah dari biji kakao tanpa fermentasi dan tanpa sangrai), gula sukrosa 55%, dan bubuk kedelai instan 15% (b/b), sebagai formula B. Penyiapan produk minuman ini juga menggunakan teknik ko-kristalisasi. Dari kedua formula minuman imunomodulator, formula B (kombinasi bubuk kakao dengan bubuk instan kedelai) memberikan efek imunomodulasi yang lebih tinggi. Bahkan pada pemberian dosis 39 (mg/kg berat mencit), secara in vivo, menghasilkan respon imun non spesifik dengan indeks fagositik 2,042 (kuat), titer antibodi primer 1:384 dan titer antibodi sekunder 1:768, sebagai respon imun humoral, dan IFN- $\gamma$  sebesar 1.436.60,14 (pmol) dan IL-2 sebesar 941,30 (pmol), sebagai respon imun selular, yang semuanya berada diatas nilai kontrol.*

**Kata kunci:** *minuman cokelat instan, imunomodulator, biji kakao tanpa fermentasi dan tanpa sangrai, bubuk kedelai instan.*

## PENDAHULUAN

Lingkungan di sekitar manusia mengandung berbagai jenis unsur patogen, seperti bakteri, virus, fungi, protozoa dan parasit yang dapat menyebabkan infeksi pada tubuh manusia. Infeksi yang terjadi, umumnya singkat dan jarang meninggalkan kerusakan permanen, disebabkan karena tubuh manusia memiliki sistem imun yang melindungi tubuh terhadap unsur-unsur patogen tersebut (Roit *et al*, 1993). Namun seiring dengan bertambahnya usia, sistem imun tersebut akan menurun. Salah satu upaya untuk mempertahankan sistem imun dalam tubuh adalah dengan mengonsumsi makanan atau minuman yang mempunyai efek imunomodulasi.

Imunomodulator adalah sejenis senyawa tertentu yang dapat meningkatkan pertahanan tubuh baik secara non-spesifik maupun secara spesifik, melalui mekanisme imun atau pertahanan seluler atau humoral. Imunomodulator berfungsi untuk memperbaiki sistem imun tubuh dengan cara mengembalikan fungsi sistem imun (imunorestorasi), menstimulasi (imunostimulan) imun yang terganggu, atau menekan (menormalkan) reaksi (imunodepresan) imun yang mengalami kondisi abnormal (Subowo, 2009).

Mengingat manfaat positif dari kakao (*Theobroma cacao L*) yang kaya akan senyawa fenolik, sebagai makanan atau minuman cokelat terhadap kesehatan tubuh telah banyak diketahui, seperti dapat mencegah dan mengurangi resiko penyakit jantung dan kanker (Corti *et al.*, 2009, Wong dan Lua, 2012, dan Khan *et al.*, 2014), meningkatkan sensitivitas insulin, menurunkan resistensi insulin, dan menurunkan tekanan darah sistolik (Grassi *et al.*, 2005), namun efek imunomodulasinya baik dalam bentuk ekstrak atau dalam bentuk makanan atau minuman cokelat, belum banyak dilaporkan (Suardita *et al.*, 2014).

Efek imunomodulasi suatu sediaan atau produk jadi, secara praklinis ditentukan melalui uji respon imun non - spesifik dan respon imun spesifik secara *in vivo* dengan menggunakan hewan coba. Respon imun non-spesifik diantaranya dapat ditentukan berdasarkan uji bersihan karbon dan indeks fagositik *retikuloendotelium*, sedangkan respon imun spesifik berdasarkan uji titer antibodi (sebagai respon imun humoral) dan sitokin (sebagai respon imun selular) (Faradilla, dan Iwo, 2014).

Terkait dengan efek imunomodulasi kakao ini, penelitian yang dilakukan oleh Suardita *et al.*, (2014) adalah sebatas pada efek ekstrak etanol

biji kakao (sebagai sediaan) pada produksi sitokin, senyawa ekstraseluler yang dapat mempengaruhi aktifitas sistim imun. Hal ini diperoleh dari hasil pengukuran aktifitas dan kapasitas fagositosis sel makrofag peritoneum mencit yang diinfeksi bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Indeks fagositik ekstrak etanol tidak dilaporkan.

Tanaman lain yang memiliki respon imun yang cukup tinggi, adalah kedelai (*Glycinemax*), dalam hal ini biji kedelai yang kaya akan isoflavan yang merupakan subkelas dari flavonoid. Pada penelitiannya, Fihiruddin (2013) melaporkan bahwa susu kedelai memiliki aktifitas imunostimulan pada respon imun humoral, dan tidak pada respon imun seluler. Hasil ini diperoleh melalui pengukuran imonoglobulin (IgG) dan proliferasi sel limfosit mencit yang diinduksi hepatitis B.

Atas dasar tersebut diatas, pada penelitian ini, dilakukan formulasi minuman instan coklat dari biji kakao tanpa fermentasi dan tanpa sangrai sebagai minuman imunomodulator. Formulasi dilakukan dengan dan tanpa kombinasi dengan bubuk kedelai instan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek imunostimulasi minuman coklat baik yang diformulasi dengan

bubuk kedelai instan maupun dengan *non dairy creamer*.

## METODOLOGI

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada pembuatan minuman instan coklat sebagai minuman imunomodulator, meliputi biji kakao dari Kabupaten Bantaeng, biji kedelai, gula sukrosa, *non-dairy creamer* dan kemasan kantong aluminium foil dari swalayan di Makassar.

Bahan untuk uji efek imunomodulasi minuman instan coklat, meliputi koloid karbon, aquades, larutan Alsever, sel darah merah domba, ovalbumin (Sigma grade), Zymosan A (Sigma grade), natrium klorida steril bebas pirogen, kit penentu titer interferon gama mencit (*Mouse interferon gamma Elisa Ready Set Go, eBioscience*), gelatin, dan asam asetat.

Alat proses yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat-alat untuk penyiapan biji kakao tanpa fermentasi (palu pemecah buah, *depulper* dan para-para penjemuran biji kakao), alat penyiapan bubuk kakao (pemisah kulit ari, *universal conching machine*, alat pengempa lemak kakao, mesin pembubuk kakao dan pengayak bubuk kakao), dan alat pembuatan minuman instan coklat (alat ko-kristalisasi, timbangan digital, dan *mixer*).

Alat uji efek imunomodulasi minuman instan

cokelat meliputi spektrofotometer, inkubator, sentrifuga, mikropipet berbagai ukuran volume, mikroskop, *multichannel* pipet, alat suntik oral mencit, plat untuk menentukan HA titer, Elisa reader, *plate washer*, dan alat-alat gelas.

## METODE PENELITIAN

### Penyiapan kakao bubuk

Biji kakao kering tanpa fermentasi dan tanpa sangrai, dikeluarkan kulit arinya. Keping biji kemudian digiling dengan menggunakan *universal couching machine* kapasitas 25 kg, sehingga diperoleh pasta kakao. Selanjutnya pasta kakao dikempa untuk memisahkan lemak kakao dari bungkil kakao. Bungkil kakao yang diperoleh digiling dengan menggunakan mesin pembubuk kakao kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran mesh 200.

### Penyiapan bubuk kedelai instan

Biji kedelai utuh direndam di dalam air dengan perbandingan kedelai : air = 1:3 (b/v) selama satu malam untuk melunakkan dan mengurangi rasa langu biji dan memudahkan pelepasan kulit ari. Biji kemudian dicuci dan dilepaskan kulit arinya, kemudian direbus selama 30 menit untuk melunakkan biji dan menon-aktifkan kegiatan enzim lipoksigenase. Biji kemudian digiling dengan mesin penggiling

atau blender dengan menambahkan air panas dengan perbandingan biji kedelai : air = 1:3 ( b/v) untuk memperoleh bubur kedelai. Bubur kedelai kemudian disaring untuk mendapatkan ekstrak, yang selanjutnya diproses lagi menjadi bubuk kedelai instan dengan menggunakan mesin pengering semprot (*spray dryer*), pada suhu *inlet* 120<sup>0</sup> C dan *outlet* 70<sup>0</sup> C (Prमितasari, 2010).

### Pembuatan minuman instan cokelat

Minuman instan cokelat, sebagai minuman imunomodulator, dibuat dengan teknik ko-kristalisasi dengan menggunakan alat ko-kristalisasi. Formulasi produk dibuat dalam 2 (dua) formula. Komposisi bahan penyusun berdasarkan berat masing-masing bahan adalah Formula A: gula sukrosa 55 %, bubuk kakao 30% (diolah dari biji tanpa fermentasi dan tanpa sangrai), gula sukrosa 55%, dan *non-dairy creamer* 15%, dan Formula B: bubuk kakao 30% (diolah dari biji tanpa fermentasi dan tanpa sangrai), gula sukrosa 55%, dan bubuk kedelai instan 15 %. Perbandingan komposisi gula sukrosa 55% dan bubuk kakao 30% ini mengacu pada formula pembuatan minuman instan cokelat - jahe, sebagai minuman fungsional, dari penelitian Rosniati (2011). Hanya disini

bubuk kakao diolah dari biji kakao fermentasi dan sangrai.

Gula sukrosa ditambah dengan air bersih sebanyak 0,5% dari berat gula sukrosa dimasukkan kedalam wadah ko-kristalisasi, dan kemudian dipanaskan pada suhu 100° C. Sambil terus diaduk, larutan gula dibiarkan mendidih sampai larutan menjadi jenuh. Setelah larutan gula menjadi jenuh, suhu pemanasan diturunkan ke suhu sekitar 60 ° C, kemudian ditambahkan kakao bubuk dan *non - dairy creamer* (atau bubuk kedelai instan) sampai adonan berubah ke bentuk butiran kristal dengan kadar air sekitar 2%. Selanjutnya butiran - butiran kristal diangin-anginkan kemudian digiling menggunakan mesin giling atau *blender* untuk selanjutnya diayak dengan menggunakan ayakan mesh 60.

#### **Penyiapan suspensi koloid karbon dan antigen**

Suspensi koloid karbon untuk uji imun non - spesifik dengan metode bersihan karbon, dibuat melalui suspensi koloid karbon 1,6 ml tinta cina pelikan B-17 ke dalam 8,4 ml gelatin 1% b/v dalam larutan NaCl bebas pirogen. Suspensi antigen untuk uji imun spesifik adalah suspensi sel darah merah segar domba (SRBC) yang disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Pelet dipisahkan dan dicuci dengan larutan dapar pospat

sebanyak tiga kali. Dengan menambahkan NaCl fisiologis steril bebas pirogen, diperoleh suspensi SRBC 10 % v/v.

#### **Uji efek imunomodulasi**

Uji efek imunomodulasi minuman instan cokelat, sebagai minuman imunomodulator dilakukan dengan mengacu pada penelitian Faradilla dan Iwo (2014), yang meliputi uji respon imun non - spesifik melalui uji bersihan karbon oleh sistim retikuloendotelium (aktifitas fagositosis, indeks fagositik dan indeks organ) dan uji respon imun spesifik (melalui penentuan titer antibodi sebagai respons imun humoral dan kadar sitokin sebagai respon selular). Hewan coba adalah mencit betina galur Swiss Webster usia delapan minggu dengan bobot 24-28 gram, yang diperoleh dari Laboratorium Perhewan Sekolah Farmasi ITB. Pakan standar (zymosan A) sebagai pembanding, dan aquades (sebagai minuman kontrol) diberikan berlebih.

Pada uji respon imun non-spesifik, minuman instan cokelat diberikan pada mencit secara oral dengan volume pemberian 1 ml/20 gram, dalam dua dosis 39 mg/kg dan 19,5 mg/kg bb mencit setiap hari selama 7 hari berturut-turut. Pada hari ke-8, disuntikkan partikel asing koloid karbon secara intravena (0,1 ml/10 gr bb mencit). Sampel darah mencit

diambil sebelum dan pada menit ke-5 (T5), dan menit ke-15 (T15) setelah penyuntikan koloid karbon.

Pada uji respon imun spesifik, minuman instan cokelat diberikan pada mencit secara oral setiap hari selama 10 hari dengan dosis yang sama pada uji imun non-spesifik. Suspensi SRBC  $1 \times 10^6$  sel/ml, disuntikkan pada mencit secara intraperitoneal, dimulai pada hari ke-3 pemberian minuman instan. Untuk uji titer antibodi primer, sampel darah mencit diambil pada hari ke-7 imunisasi. Untuk uji titer antibodi sekunder, suspensi SRBC kembali disuntikkan pada mencit, Sampel darah mencit diambil pada hari ke-7 setelah imunisasi yang kedua (Faradilla dan Iwo, 2014).

Pada uji respons imun selular, minuman cokelat diberikan pada mencit seperti pada uji terhadap respons imun humoral. Pada end point pengujian, mencit dikorbankan dengan menggunakan gas  $\text{CO}_2$ . Selanjutnya segera darah mencit diambil dengan cara punksi jantung dan serumnya dipisahkan dengan cara sentrifuga dengan kecepatan 12.000 rpm. Kadar interferon gama dan IL-2 ditentukan dengan menggunakan kit Elisa untuk IFN  $\gamma$  dan IL-2 mencit (Faradilla dan Iwo, 2014).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kecepatan eliminasi dan indeks fagositik sistem retikuloendotelial mencit setelah pemberian sampel minuman instan cokelat formula A dan B dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa kecepatan eliminasi partikel karbon oleh sistem retikuloendotelium mencit pada pemberian kelompok minuman instan cokelat formula A dan B ( $>0.024$ ), lebih tinggi dibandingkan dengan kecepatan eliminasi karbon pada pemberian minuman kontrol ( $0.024 \pm 0.019$ ). Hal ini lebih diperjelas pada indeks fagositik partikel karbon pada kelompok mencit yang diberi minuman cokelat formula A dan B lebih besar dari indeks fagositik pada kontrol.

Menurut Wagner (1989) dalam Faradilla dan Iwo (2014), jika indeks fagositik sediaan uji memiliki nilai kurang dari 1, menunjukkan sediaan tersebut tidak bersifat imunostimulasi, indeks fagositik antara 1-1,5 menunjukkan efek imunostimulasi sedang, dan indeks fagositik lebih dari 1,5 menunjukkan efek imunostimulasi kuat. Semakin meningkatnya indeks fagositik pada uji bersihan karbon menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis dari makrofag dan peningkatan imun non-spesifik.

Tabel 1. Kecepatan eliminasi dan indeks fagositik sistem retikuloendotelial mencit setelah pemberian sampel minuman instan coklat formula A dan B.

Kel . Uji	Dosis (mg/kg bb)	OD			Ln OD		Kecepatan eliminasi	Indeks fago-sitik
		T0	T5	T15	Ln T5	Ln T15		
FA	19.5	0.055±0.006	0.144±0.066	0.103±0.029	2.003±0.443	2.301±0.293	0.030±0.019	1,250
	39	0.057±0.003	0.144±0.026	0.103±0.023	1.949±0.181	2.292±0.247	0.034±0.012	1,417
FB	19.5	0.058±0.005	0.179±0.009	0.129±0.015	1.719±0.049	2.050±0.116	0.033±0.015	1,375
	39	0.059±0.001	0.182±0.058	0.126±0.022	1.736±0.317	2.085±0.180	0.049±0.005	2,042
ZA	10	0.057±0.005	0.177±0.006	0.127±0.004	1.730±0.036	2.066±0.028	0.034±0.005	1,417
K	0	0.059±0.003	0.198±0.012	0.158±0.030	1.625±0.124	1.861±0.204	0.024±0.019	1,000

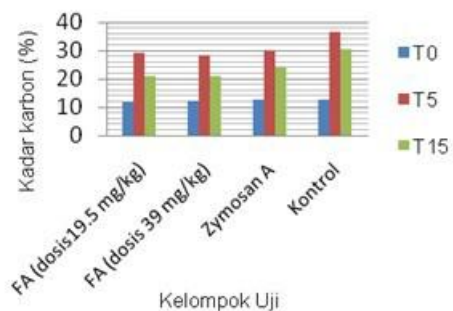
Dosis pemakaian pada manusia (1x dosis = 300 mg) ekuivalen dengan dosis 39mg/kg bb mencit.  
Ket : FA: Formula A, FB : Formula B, ZA : Zymosan A, dan K : Kontrol.

Berdasarkan klasifikasi efek imunostimulasi tersebut, maka minuman instan coklat formula A pada dosis 19,5 dan 39 mg/kg bb, dan formula B pada dosis 19,5 mg/kg bb, menunjukkan efek imunostimulasi sedang, sedangkan minuman instan coklat formula B, (kombinasi bubuk kakao dan bubuk kedelai instan) pada dosis 39 mg/kg bb, menunjukkan efek imunostimulasi kuat dengan indeks fagositik 2,042 (Tabel 1).

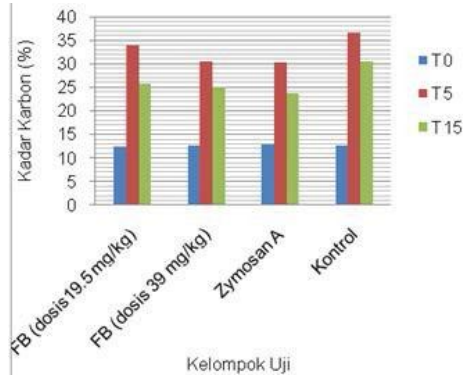
Namun demikian hasil uji bersihan karbon dan indeks fagositik masih menunjukkan bahwa pada kedua dosis minuman instan coklat, baik formula A maupun formula B, dapat meningkatkan aktivitas makrofag. Zymosan A digunakan sebagai pembanding, dimana zat ini bersifat imunostimulasi.

### Kadar karbon dalam darah mencit

Hasil uji respon imun non-spesifik dengan metode bersihan karbon (*carbon clearance*), dalam hal ini sisa karbon di dalam darah mencit sebelum dan pada menit ke-5 dan ke-15 setelah induksi koloid karbon untuk kelompok uji formula A disajikan pada Gambar 1a, sedangkan untuk kelompok uji formula B disajikan pada Gambar 1b.



**Gambar. 1a.** Kadar sisa karbon dalam darah mencit sebelum dan setelah pemberian sampel minuman instan coklat (Formula A)



**Gambar 1b.** Kadar karbon dalam darah mencit sebelum dan setelah pemberian sampel minuman instan coklat (Formula B).

Dari Gambar 1a dan 1b, pada menit ke-15 (T15) terjadi penurunan kadar sisa karbon di

dalam darah mencit setelah induksi koloid karbon dibandingkan dengan sebelum induksi koloid karbon untuk semua kelompok uji. Kadar karbon akan berkurang jumlahnya di dalam darah seiring pertambahan waktu, karena adanya peristiwa fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama neutrofil, monosit, makrofag dan eosinofil (Baratawidjaya, 2009).

Tabel 2. Indeks organ mencit setelah pemberian minuman instan coklat formula A dan B.

Kel. Uji	Dosis (mg/kg bb)	Indeks organ (%)		
		Hati	Limpa	Kelenjar. Thymus
F A	19.5	5.83±0.95	0.34±0.15	0.42±0.08
	39	5.22±0.40	0.31±0.07	0.42±0.04
F B	19.5	5.39±0.31	0.32±0.02	0.45±0.05
	39	5.42±0.61	0.33±0.03	0.41±0.01
Z A	10	5.82±0.34	0.43±0.03 <sup>c</sup>	0.43±0.01
K	0	5.63±0.79	0.31±0.04	0.40±0.09

### Indeks organ

Hasil penentuan indeks organ mencit setelah pemberian sampel minuman instan coklat formula A dan B dapat dilihat pada Tabel 2. Pada Tabel 2, terlihat bahwa Indeks organ hati mencit setelah pemberian minuman instan coklat formula A dan B lebih kecil dibandingkan dengan kontrol kecuali untuk formula A dosis 19.5 mg/kg bb, tetapi untuk indeks organ limpa dan kelenjar

thymus secara umum menunjukkan nilai lebih tinggi dari nilai kontrol. Secara statistik, hanya indeks limpa kelompok minuman pembanding (Zymosan A) yang bermakna ( $p < 0,01$ ) dibandingkan terhadap kontrol.

Meskipun organ hati tidak termasuk limfoid primer atau sekunder, tetapi hati sangat berperan dalam system imun karena mengandung makrofag terfiksasi yaitu sel-sel kuffer.



Limpa merupakan organ limfoid sekunder, selain mengandung sel limfosit B dan limfosit T yang berperan pada proses respon imun spesifik, juga mengandung sel dendritik dan makrofag yang berperan sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) yang berfungsi menyajikan antigen kepada sel limfoid. Limpa juga merupakan bagian penting dari sistem retikuloendotelial yang mengandung limfosit, monosit dan makrofag (Deng, *et al.* 2009).

Peningkatan sel-sel imun tersebut berkorelasi dengan bobot limpa. Kenaikan bobot limpa relatif ini menunjukkan adanya efek minuman coklat terhadap aktivitas imunostimulan (Kresno, 1996). Makrofag organ hati, limpa dan kelenjar thymus bertanggung jawab terhadap proses fagositosis benda asing untuk pertahanan tubuh baik dalam imunitas daptan maupun bawaan (Deng *et al.*, 2009, dan Kim *et al.*, 2001).

Menurut Kim *et al* (2001) makrofag memiliki peranan penting pada semua tahap pertahanan tubuh baik dalam imunitas daptan maupun bawaan. Saat pathogen berhasil melewati barier epitel, bakteri pathogen akan difagositosis oleh makrofag dan didigesti menggunakan enzim lisosomal.

### **Efek Minuman instan coklat terhadap respon imun humoral**

Efek minuman instan coklat terhadap respon imun

humoral melalui penentuan titer antibodi primer dan sekunder dapat dilihat pada Tabel 3. Titer antibodi menunjukkan aktifitas respon imun humoral yang melibatkan interaksi antara limfosit B dan antigen yang mengakibatkan terjadinya proliferasi dan diferensiasi limfosit B menjadi sel plasma yang mensekresikan antibodi (Dashputre dan Nakwade, 2010).

Antibodi berfungsi sebagai efektor respon humoral dengan cara berikatan dengan antigen dan menetralsir atau memfasilitasi proses eliminasi antigen yang lebih mudah difagositis oleh makrofag (Dashputre dan naikwade, 2010). Dari Tabel 3, terlihat bahwa titer antibodi primer kelompok formula A dosis 39 mg/kg bb dan formula B (kombinasi bubuk kakao dan bubuk kedelai instan) pada dosis 19.5 mg/kg bb dan 39 mg/kg bb, lebih tinggi dibanding kontrol. Titer antibodi sekunder kelompok formula B pada dosis 39 mg/kg bb lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Peningkatan titer antibodi primer menunjukkan bahwa adanya stimulasi terhadap limfosit B, limfosit T dan makrofag. Peningkatan titer antibodi sekunder menunjukkan adanya stimulasi terhadap memori sel B pada proses pembentukan antibodi (Faradilla dan Iwo, 2014).

**Tabel 3.** Efek Minuman Instan Cokelat Terhadap Titer antibody primer dan sekunder.

Kel. Uji	Dosis (mg/kg bb)	Titer antibodi	
		Primer	Sekunder
F A	19.5	1:128	1:384
	39	1:256	1:512
F B	19.5	1:256	1:512
MP	10	1:32	1:32
K	0	1:192	1:512

Ket : MP :Metil Prednisolon

**Tabel 4.** Efek Minuman Cokelat Terhadap Kadar Sitokin (IFN- $\gamma$  dan IL-2)

Kel. Uji	Dosis (mg/kg bb)	Kadar sitokin (pmol)	
		IFN- $\gamma$	IL-2
FA	19.5	49814.5	1241.10
	39	714474.76	808.42
FB	19.5	115610.98	1493.97
	39	1436360.14	941.30
K	10	516334.69	778.45

**Efek Minuman coklat Terhadap Respon imun Seluler**

Efek minuman coklat terhadap respon imun seluler melalui penentuan kadar sitokin (IFN- $\gamma$  dan IL-2) dapat dilihat pada Tabel 4. Kadar sitokin di dalam darah mencit melalui pengukuran interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) dan IL-2, menunjukkan nilai yang lebih tinggi pada pemberian minuman instan coklat formula B dibandingkan dengan pemberian formula A. Formula B (kombinasi bubuk kakao dan bubuk kedelai instan) sendiri memberikan kadar sitokin

yang lebih tinggi dari formula A (tanpa penambah bubuk kedelai instan). Fungsi utama sistem imun seluler adalah untuk pertahanan terhadap bakteri intraseluler, virus, jamur, parasit dan keganasan (Baratawidjaya, 2000).

Menurut Abbas *et al* (1996) interferon gamma secara simultan mempromosikan imunitas seluler melalui pembentukan sel-sel Th 1. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Saifulhaq (2009) menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dapat meningkatkan produksi IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit. Proliferasi limfosit T yang

dirangsang oleh antigen, terutama diatur oleh pengaruh IL-2 terhadap reseptor IL-2 yang dimiliki pada permukaan selnya. Selain itu, IL-2 juga merangsang proliferasi dan diferensiasi sel B dan NK. Flavonoid memiliki efek imunostimula dengan memacu produksi IL-2 yang meningkatkan proliferasi (Middleton *et al*, 2000).

Lebih kuatnya efek imunomodulasi pada minuman instan coklat formula B (kombinasi bubuk kakao dan bubuk kedelai instan) dibandingkan dengan formula A (tanpa penambahan bubuk kedelai instan), menunjukkan adanya sinergi yang baik antara senyawa flavonoid pada kakao dengan senyawa isoflavon pada kedelai.

### SIMPULAN

Formulasi minuman instan coklat dari bubuk kakao (diolah dari biji kakao tanpa fermentasi dan tanpa sangrai) yang dikombinasikan dengan bubuk

kedelai instan, menghasilkan produk minuman instan coklat dengan efek imunostimulasi yang kuat, pada uji in-vivo, yang ditunjukkan oleh nilai indeks fagositiknya. Sedangkan yang diformulasi tanpa penambahan bubuk kedelai instan (tetapi dengan *non-dairy creamer*) hanya memiliki efek imunostimulasi sedang, meski masih dapat meningkatkan aktivitas makrofag. Hasil uji terhadap respon imun spesifik, juga menunjukkan nilai respon imun humoral dan respon imun selular yang lebih tinggi pada minuman instan coklat yang diformulasi dari kombinasi bubuk kakao dan bubuk kedelai instan. Dibandingkan dengan kontrol (minuman aquades), minuman instan coklat yang diformulasi tanpa penambahan bubuk kedelai instan, masih memiliki nilai respon imun spesifik yang lebih tinggi, khususnya pada dosis 39 mg/kg bb mencit.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Abbas, S.K., K.M. Murphy, dan S. Sher (1996), Functional Diversity of Helper T, lymphocytes *Nature* 383: 787-793.
2. Baratawidjaja, K.G, 2000. *Imunologi Dasar*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
3. Bratawidjaja, K.G dan Rengganis, I , 2009. *Imunologi Dasar*, Edisi VIII. Jakar : Penerbit Universitas Indonesia.
4. Corti, R; Flammer, A.J; Hollenberg, N.K; & Luscher, T.F. 2009. Cocoa and cardiovascular health. *Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine. Circulation* 119, 1433 – 1441.

- DOI : 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827022.
5. Dashputre N.L dan Nakwade, 2010. Immunomodulatory Activity of Abutilon Indicum Linn on Albino Mice. International Journal of Pharma Science& Research. 1 (3) : 178 -184.
  6. Deng X, Wu F, Liu Z, Luo M, Li L, Ni Q. 2009. The toxicity of water soluble multi-walled carbon nanotubes in mice. Carbon. 2009. 47: 1421-28.
  7. Faradilla, M dan Immaculata Iwo, M. 2014. Efek Immunomodulator Polisakarida Rimpang Temu Putih. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, ISSN 1693 – 1831, hal. 273-278.
  8. Fihiruddin, 2013. Pengaruh pemberian susu kedelai terhadap respon antibody dan proliferasi sel limposit pada mencit BABL/C yang diinduski dengan vaksi hepatitis B. Media Bina Ilmiah 43. Vol 7 (5). ISSN.No. 1978 – 3787.
  9. Grassi, D. C. Lippi, S. Necozione, G. Desideri, and C. Ferri. 2005. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons American Journal of Clinical Nutrition. ( 81 ) : 611-614.
  10. Khan , N; Khymenets, O; Urpi-Sarda, M; Tulipani, T ; Gracia – Aloy, M ; Monagas, M ; Mora-Cubillos, X; Llorach, R & Andres-Lacueva, C, 2014. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular 2072- 6643. DOI : 10.3390/nu6020844.
  11. Kim KI, Shin KS, Jun WJ, Hong BS, Shin DH, Cho HY. 2001. Effects of polysaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. Biotechnol Biochem. 2001. 65(11): 2369-777.
  12. Kresno, S. B. (1996). *Imunologidiagnosa dan prosedur laboratorium* (edisi ke-4). Jakarta: Universitas Indonesia.
  13. Middleton, E., Kandaswami C., dan Theoharides T.C. 2000. The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. Pharmacological Reviews, 52 (4):673-751
  14. Roit IM, Brostoff J, Male J. 1993. *Immunology*. 3rd ed. St Louis Mosby Co;
  15. Rosniati, 2011. Pengaruh Suhu Pemanasan Ekstrak Jahe dan Sukrosa Terhadap Karakteristik Instan Jahe – Cokelat. *JIHP* vol 6 (2) : 51 – 58.
  16. Suardita, I.W; D.C, Mufida dan Misnawi, 2014. Efek

- Imunomodulasi Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cocoa* L) Terhadap Aktifitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit Yang Diinfeksi Bakteri *Staphylococcus epidermis*. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa.  
<http://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/59369/1%20Waya.Diakses18>  
Pebruari 2015.
17. Subowo, 2009, *Imunobiologi*, Edisi II, 12-13, 153, Sagung Seto, Jakarta
18. Wagner, H., and K. Jurcic, 1991. Assay for Immunomodulation and Effects on Mediators of Inflammation, in *Methods in Plant Biochemistry*, K. Hostettmann, (Ed.), Vol. VI, Academic Press, Toronto.
19. Saifulhaq, M. 2009. Pengaruh pemberian Ekstrak Buah Mahkota Dewa Dosis Bertingkat Terhadap Proliferasi Limfosit Lien pada Mencit BALB/C. *Biomedika* 1.2.33
20. Wong, S.Y, dan PL Lua. 2012. Effects of dark chocolate consumption on anxiety, depressive symptoms and health related quality of life status among cancer patients. *Health and Environment Journal* (3): 27-35.